

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 4月 2日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-100431

[ST.10/C]:

[JP2002-100431]

出 願 人

Applicant(s):

理化学研究所
株式会社ダナフォーム

REC'D 21 MAR 2003	
WIPO	PCT

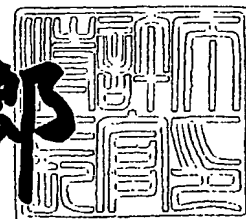
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月 4日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3013120

【書類名】 特許願

【整理番号】 02766

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 2 2 - 1 - 2 0 1

 【氏名】 林崎 良英

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区樽町 3 - 6 - 1 3

 【氏名】 鈴木 治和

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 - 7 - 2 2

 【氏名】 金森 睦

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目 3 - 3 5 株式会社ダナフォーム
内

 【氏名】 マチアス ハーバース

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目 3 - 3 5

 【氏名又は名称】 株式会社ダナフォーム

 【代表者】 林 利蔵

【代理人】

 【識別番号】 100088546

 【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053235

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ポリペプチド及びそれをコードする核酸

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチド。

【請求項2】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～32個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列中、第1、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し若しくは欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置に各1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項2記載のポリペプチド。

【請求項4】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域を含む請求項2記載のポリペプチド。

【請求項5】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中、第1、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置に1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有し、TRAF2との結合能を有する請求項2記

載のポリペプチド。

【請求項6】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する請求項w5記載のポリペプチド。

【請求項7】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチド。

【請求項8】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有するペプチド又は該アミノ酸配列において、1～32個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項7記載のポリペプチド。

【請求項9】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列中、第1、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置並びに第25番目と第26番目の間の位置の少なくともいずれかに各1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項8記載のポリペプチド。

【請求項10】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域を含む請求項8記載のポリペプチド。

【請求項11】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中、第1、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置並びに第25

番目と第 2 6 番目の間の位置の少なくともいずれかに 1 ～ 3 個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 1 2】 配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 1 1 記載のポリペプチド。

【請求項 1 3】 配列表の配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 1 6 2 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列と 7 0 % 以上の相同性を有する領域を含み、TRAF2 との結合能を有するポリペプチド。

【請求項 1 4】 前記相同性が 8 0 % 以上である請求項 1 3 記載のポリペプチド。

【請求項 1 5】 配列表の配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列と 7 0 % 以上の相同性を有し、TRAF2 との結合能を有するポリペプチド。

【請求項 1 6】 前記相同性が 7 8 % 以上である請求項 1 5 記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】 請求項 1 ないし 1 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 1 8】 配列表の配列番号 2 又は 4 で示される塩基配列を有する核酸又は該核酸の相補配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズする請求項 1 7 記載の核酸。

【請求項 1 9】 請求項 1 7 又は 1 8 記載の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクター。

【請求項 2 0】 請求項 1 7 又は 1 8 記載の核酸が導入された細胞であって、請求項 1 ないし 1 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを発現する細胞。

【請求項 2 1】 請求項 1 7 又は 1 8 記載の核酸とハイブリダイズする核酸であって、請求項 1 7 又は 1 8 記載の核酸の検出に用いることができる核酸。

【請求項 2 2】 配列表の配列番号 2 又は 4 記載の塩基配列を有する核酸とハイブリダイズする請求項 2 1 記載の核酸。

【請求項 2 3】 プライマー又はプローブである請求項 2 1 又は 2 2 記載の核酸。

【請求項 2 4】 塩基数が 1 5 以上である請求項 2 1 ないし 2 3 のいずれか

1 項に記載の核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腫瘍壊死因子レセプター関連因子 2 (TRAF2) と結合する新規なポリペプチド及びそれをコードする核酸に関する。

【0002】

【従来の技術】

腫瘍壊死因子レセプター関連因子 (TRAFs) は、TNF レセプターファミリーを介したシグナル伝達経路上のアダプタータンパク質であることがわかっている。TRAF 遺伝子ファミリーは、TRAF1 ないし TRAF6 の 6 種類の遺伝子から成り、各タンパク質のカルボキシ末端の保存された TRAF ドメインにより特徴付けられる (1-5)。TRAF ファミリーの中で、TRAF2 は、TNF-媒介シグナル伝達経路に包含される。TNF レセプター 1 (TNFR1) が TNF により刺激されると、TNFR1 が、TRADD (TNFR-関連死ドメインタンパク質 (TNFR-associated death domain protein) のアミノ末端を介して間接的に TRAF2 を集める (6,7)。活性化された TRAF2 は、NF- κ B 及び AP-1 の活性化を媒介する RIP (8,9) 及び ASK1 (10) を包含する数種類のタンパク質を集め、その結果、細胞性又は免疫性の機能を有する多くの遺伝子が誘導される (11,12)。TRAF2 の相互作用に加え、TRADD はまた、death ドメインを有するアダプター分子である FADD と相互作用する (13)。FADD は、細胞死プロテアーゼカスケードの開始プロテアーゼであるキャスパーゼ (caspase)-8 を集めて活性化し、アポトーシスを引き起こす (14)。従って、TRAF2 は、TNF-媒介細胞生存において鍵となる分子であり、ここでは種々のタンパク質が TRAF2 との相互作用によってシグナル伝達経路を制御している。

【0003】

従って、TRAF2 と結合する新規なタンパク質を見出し、特徴付けることは、TNF-媒介シグナル伝達経路に関与する生理学的及び病理学的過程の理解にとって重要である。また、このようなタンパク質は、TNF-媒介シグナル伝達経路が関与する疾病の診断および治療の対象としての用途を有する可能性がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、TRAF2と結合する新規なタンパク質及びそれをコードする核酸を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、マウス cDNA ライブラリーから、哺乳動物 2-ハイブリッドアッセイ (mammalian two-hybrid assay) により、TRAF2 と結合する新規なタンパク質をコードする cDNA を見出し、かつ、これによりコードされるタンパク質が TRAF2 と結合することを実験的に確認して本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は、配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40 個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2 との結合能を有するポリペプチドを提供する。また、本発明は、配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40 個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2 との結合能を有するポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクターを提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸が導入された細胞であって、上記本発明のポリペプチドを発現する細胞を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸とハイブリダイズする核酸であって、上記本発明の核酸の検出に用いることができる核酸を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

下記実施例に詳述する方法により、マウス生後 3 日目の胸腺由来の cDNA ラ

イブラリーから、哺乳動物 2-ハイブリッドアッセイの手法を用いて、TRAF2と結合する新規なポリペプチドをコードする cDNA を見出した。その塩基配列を、推定アミノ酸配列と共に配列番号 4 に示す。配列番号 3 には、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列のみを取り出して示す。このポリペプチドを、「T2BP」(TRAF2-binding protein)と命名した。また、BLASTによる相同性検索により、ヒトの機能未知遺伝子の中からマウス T2BP cDNA と相同性の高い cDNA を見出した。このヒト由来 cDNA の塩基配列を、推定アミノ酸配列と共に配列番号 2 に示す。配列番号 1 には、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のみを取り出して示す。配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、マウス T2BP と高い相同性(約 78%)を有し、また、フォークヘッド関連(forkhead-associated (FHA))ドメインのような特徴的なモチーフを有することから、ヒト T2BP であることは明らかである。このように、本発明のポリペプチド(T2BP)の好ましい実施例は、配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列を有する。

【0008】

下記実施例において、具体的に示されるように、T2BP の第 1 番目から第 162 番目までの領域(以下、例えば第 1 番目のアミノ酸残基を便宜的に「1aa」のように、また、例えば第 1 番目から第 162 番目のアミノ酸残基から成る領域を「1-162aa」のように記載することがある)のみから成る欠失変異体が、TRAF2 との結合能を示したことから、この領域を含んでいれば TRAF2 との結合能を有する。また、一般に生理活性を有するポリペプチドのうち、少数のアミノ酸配列が置換し、欠失し又は挿入された場合でも、該生理活性が維持されることがあることは周知である。実際、ヒトとマウスの T2BP では、1-162aa の領域で 32 個のアミノ酸残基が相違している(相同性約 80%)。従って、本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40 個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2 との結合能を有するポリペプチドと定義される。置換、欠失、挿入されるアミノ酸数は、上記した 32 個以下であることが好ましい。

【0009】

配列番号1のアミノ酸配列の1-162aaにおいて、配列番号3のアミノ酸配列の1-162aaと相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されと考えられる。

【0010】

同様に、配列番号3のアミノ酸配列の1-162aaにおいて、配列番号1の1-162aaのアミノ酸配列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。さらに、配列番号1では、配列番号3の25aaと26aaの間にアミノ酸残基が挿入されていることから、配列番号3の25aaと26aaの間に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されと考えられる。

【0011】

上記の通り、1-162aa断片がTRAF2との結合能を有することは実験的に確認されているが、1-184aa（全長）を有する方がTRAF2との結合能がより高いことからより好ましい。配列番号1のアミノ酸配列において、配列番号3のアミノ酸配

列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184 aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、上記の通り、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持され则认为られる。同様に、配列番号3のアミノ酸配列において、配列番号1のアミノ酸配列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184 aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。さらに、上記の通り、配列番号1では、配列番号3の25aaと26aaの間にアミノ酸残基が挿入されていることから、配列番号3の25aaと26aaの間に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、上記の通り、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持され则认为られる。

【0012】

本発明のポリペプチドを相同性に基づいて規定すると、配列表の配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列と70%以上の相同性を有する領域を含み、TRAF2との

結合能を有するポリペプチドである。配列番号1と3の1-162aaの相同性は、約80%であるので、1-162aaの相同性は80%以上であることが好ましい。また、上記の通り、配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列の全長を有することがより好ましいが、この場合の両者の相同性は約78%であるので、全長の相同性は78%以上であることが好ましい。なお、ここで言う、相同性は、図1のBに示されるように、両者のポリペプチドのアミノ酸残基ができるだけ多く一致するように整列させ、一致しているアミノ酸残基の数を全体のアミノ酸残基の数で除することにより計算できる。なお、このような相同性の計算は、BLASTのような市販のソフトを用いて容易に行うことができる。長さが異なる配列同士を比較する場合には、短い方のアミノ酸残基数で除する。

【0013】

本発明のポリペプチドは、下記実施例に詳述する方法によっても生産できるし、本発明によりそれをコードするcDNAの塩基配列が明らかになったので、RT-PCR等の常法によりポリペプチドをコードする核酸を調製し、それを常法により細胞中で発現させることにより容易に生産することができる。

【0014】

本発明は、また、上記本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。ここで言う「核酸」には、DNAもRNAも包含される。これらの核酸は、上記本発明のポリペプチドを遺伝子工学的に産生する際の鋳型として利用することができる。核酸の好ましい実施例の具体的な塩基配列は、上記の通り配列番号2及び4に示されている。また、上記の通り、置換、欠失、挿入を含むポリペプチドであって、TRAF2との結合能を有するものをコードする核酸も本発明の核酸である。このような核酸は、配列番号2又は4で示される塩基配列を有する核酸又は該核酸とストリンジェント条件下(すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5% SDS又は0.1% SDSといった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて50～65℃で、好ましくは50℃と60℃の2段階、又は、50℃、55℃、60℃、65℃の4段階で反応を行なう)でハイブリダイズするものであることが好ましい。

【0015】

本発明は、上記本発明の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクターをも提供する。このような発現ベクターは、上記本発明の核酸を市販の発現ベクターのクローニング部位に挿入することにより容易に調製することができ、下記実施例にも具体的に記載されている。また、本発明は、このような本発明の発現ベクターにより上記本発明の核酸が導入された細胞であって、上記本発明のポリペプチドを発現する細胞をも提供する。このような細胞は、上記本発明の発現ベクターを常法により宿主細胞にトランスフェクトすることにより容易に調製でき、下記実施例にも具体的に記載されている。

【0016】

本発明は、また、上記本発明の核酸とハイブリダイズする核酸であって、上記本発明の核酸の検出に用いることができる核酸（以下、便宜的に「検出用核酸」と言うことがある）をも提供する。このような核酸は、PCRやNASBA等の核酸増幅法のプライマーであってもよいし、標識を付したプローブであってもよい。プライマーの場合、ハイブリダイズしないと鋳型核酸の増幅が起きないので、増幅が起きるか否かにより該プライマーとハイブリダイズする本発明の核酸が被検試料中に含まれているか否かを調べることができる。また、プローブの場合、ハイブリダイズしないとプローブの標識が検出されないので、プローブの標識を検出することにより被検試料中に本発明の核酸が存在するか否かを検出することができる。これらの検出用核酸は、検出の特異性を高めるために、塩基数が15以上であることが好ましく、プライマーの場合には塩基数が20～50がより好ましく、プローブの場合には塩基数が20～全長が好ましい。なお、このような検出用核酸は、リアルタイム検出PCRのプライマーに用いることや、プローブの標識を定量すること等により、本発明の核酸の定量に利用することもできる。

【0017】

下記実施例で具体的に示されるように、本発明のポリペプチドは、NF- κ Bシグナルを活性化させ、それがTNFを介した伝達であることが示唆されることから、その機能を阻害することにより、NF- κ Bシグナルを減弱させることが可能である。よって、NF- κ Bシグナルが関与する疾患として炎症、リウマチなどの治療薬開発のためのターゲットとして有用である。また、NF- κ Bシグナルは破骨細胞の活

性化にも関与しているので、骨そしょう症治療薬開発のためのターゲットとしても有用である。さらに、本発明の検出用核酸は、T2BP遺伝子の発現量の測定に用いることができるので、炎症、リウマチ、骨そしょう症などの病態のモニターに使用することが可能である。また、炎症、リウマチ、骨そしょう症などの治療薬が、T2BP遺伝子の発現を抑制するものである場合やアンチセンスRNAであるような場合には、これらの治療薬の薬効の評価に用いることもできる。

【 0 0 1 8 】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。実験はすべてマウスT2BPを用いておこなった。

【 0 0 1 9 】

材料及び方法

細胞培養

10%熱不活化ウシ胎児血清(FBS)、200 U/mlペニシリン及び200 μ g/mlストレプトマイシンを添加した最少必須培地中で、ヒト胎児腎臓セルライン293 (Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R.: J Gen Virol, 36, 59-74 (1977)。理化学研究所細胞バンクから入手) を培養した。293T細胞 (DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP: Mol Cell Biol 7, 379-87 (1987)) 及びCHO-K1細胞 (Kao, F. T., Puck, T. T.: Proc Nat Acad Sci U S A, 60, 1275-1281 (1968)。理化学研究所細胞バンクから入手) は、それぞれ10% FBS及び抗生物質を添加した、ダルベッコ修飾イーグル培地及びF-12栄養混合培地 (Ham's F-12) 中でそれぞれ維持した。

【 0 0 2 0 】

哺乳動物2-ハイブリッドアッセイ

公知の方法(15)に従い行った。すなわち、先ず、次のようにして2段階PCRによりアッセイ用サンプルを調製した。T2BP及びTRAF2のcDNA (それぞれマウス生後3日目の胸腺由来のcDNAライブラリー、成マウスの精巣由来のcDNAライブラリー中に含まれる) を鋳型として各々のタンパク質コード領域を含

む領域を、タグを付けた遺伝子特異的プライマー（正鎖プライマーT2BP, gaagga gccgccaccatgtccacctttgaagacg; 正鎖プライマーTRAF2, gaaggagccgccaccatggct gcagccagtgt、公知のタンパク領域予測ソフトを用いて設計）及びベクター配列 に対するプライマー（逆鎖プライマーP8; agcggataacaatttcacacaggaaa）を 用いたPCRにより増幅した（第1段）。また、SV40 poly-AシグナルのDNA 断片及びGal4 DNA-結合ドメイン又はヘルペスウイルスV16転写活性化ドメインが 後に続くヒトサイトメガロウイルス(CMV)極初期プロモーターを増幅した（用い た正逆のプライマーの塩基配列および鋳型は、それぞれ次のとおり; SV40 poly-AシグナルのDNA断片, gtttcctgtgtgaaattgttatccgctgcagacatgataagatacattg (正)、agcaagttcagcctgggttaagatccttatcgattttaccac (逆)、pG5luc(Promega社 製); Gal4断片, ccaatatgaccgccatgttggc (正)、catggtggcggctccttcggcgatac agtcaactg (逆)、pBIND(Promega社製); VP16断片, ccaatatgaccgccatgttggc (正)、catggtggcggctccttcaagtcgacggatccctggc (逆)、pACT(Promega社製))。第2段のPCRでは、第1のPCR産物と、SV40 poly-Aシグナル断片と、G al4又はVP16断片とを連結し、PCR産物がGal4又はVP16ドメインとの融合タン パク質として発現されるように設計した。なお、第2段のPCRで用いたプライ マーの塩基配列は、gccatgttggcattgattattgac (正) 及びagcaagttcagcctgggttaa g (逆) であった。得られたPCR産物(0.13 μ l)を、20 ngのレポータープラス ミドpG5lucとともに 2.2×10^4 個のCHO-K1細胞にトランスフェクション試薬LF200 0(Invitrogen社製)を用いてトランスフェクトした。20時間インキュベートし た後、Steady-Glo (商品名) ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega社製)に よりルシフェラーゼレポーター活性を測定した。

【 0 0 2 1 】

免疫共沈降分析

T2BP及びTRAF2 cDNAのタンパク質コード領域を含む領域を、遺伝子特異 的プライマー（T2BPの正鎖用プライマーの塩基配列; gacgcgtcgaccatgtccacctt tgaagacg、TRAF2の正鎖用プライマーの塩基配列; gacgcgtcgaccatggctgcagccagt gt。逆鎖用プライマーはベクター部位に対して作成し、塩基配列はccggttaagcgg ccgcagcggataacaatttcacacaggaaac）を用いたPCRにより増幅した後に制限酵

素SalIおよびNotIで消化した断片を、発現ベクターpCMV-HA及びpCMV-Myc（いずれもClontech社製）にそれぞれサブクローニングした。トランスフェクション試薬LF2000（商品名）を用い、HA-T2BP又はMyc-T2BPを発現するための発現用ベクター $2.5\mu\text{g}$ で293T細胞(1×10^6 個)をトランスフェクトした。なお、HA又はMycは抗体が認識するタグ配列の名前を意味する。24時間インキュベートした後、細胞を回収し、10 mM of Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP40（商品名）, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and $10\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン(PEPTIDE INSTITUTE Inc. 製)から成るTNE緩衝液で溶解した。10,000 x gで15分間遠心後、上清を単離し、 $5\mu\text{g}$ の抗HAタグ抗体（Santa Cruz社製）で免疫沈降させた。共沈殿したMyc-TRAF2の検出は、ウェスタンブロット分析により行った。Laemmliサンプル緩衝液中の試料を5分間煮沸し、12.5% SDS-PAGEにかけ、タンパク質をHybond-ECL膜（Amersham社製）に転写した。ウェスタンブロットは、抗Mycタグ抗体と1時間、次いでHRP-結合抗マウス Ig G（Amersham社製）と1時間インキュベートし、次いで洗浄を行う、通常の方法により行った。シグナルの検出は、ECLシステム（Amersham社製）及びX-線フィルム（Kodak社製）を用いて行った。また、培養上清を、上記した一次抗体及び二次抗体を用いた直接的なウェスタンブロットに付すことにより、HA-T2BP及びMyc-TRAF2の発現を確認した。

【0022】

ノーザン分析

T2BP及びTRAF2 cDNAを、ノーザンブロット分析のプロープとして用いた。Random Primer Labeling Kit Ver. 2（宝酒造社製）を用いて、プロープを $[^{32}\text{P}]$ で標識した。マウスMTNブロット膜およびマウスセルラインMTNブロット膜（いずれもClontech社製）を購入した。ExpressHyb（商品名）ハイブリダイゼーション溶液（Clontech社製）を用い、 68°C で30分間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションシグナルは、X-線フィルムにより検出した。

【0023】

シグナル伝達経路分析

T2BPの発現ベクターを、100 ngのレポーターベクターpNF κ B-Luc又はpAP1-Luc（Clontech社製）とともに、トランスフェクション試薬LF2000を用いて、96穴

アッセイプレート中の 5×10^4 個の293細胞にトランスフェクトした。24時間インキュベート後、細胞を5 ng/mlのTNFで6時間処理し(+)又は処理しなかった(-)。レポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性は上記の通りに測定した。

【0024】

結果

FHAドメインを有する新規なTRAF2結合タンパク質T2BPの同定

本願発明者らは、哺乳動物2ハイブリッド法に基づく、PCR-媒介サンプル調製及び高効率アッセイシステムを開発したことを報告している(15)。このシステムを用い、マウス全長cDNAが豊富に含まれるライブラリーから得た約6000個のcDNAをマトリックス的に分析した。T2BP(TRAF2結合タンパク質)と命名された新規なTRAF2相互作用タンパク質が、VP16転写活性化ドメインに融合されたTRAF2をプレイ(pre)として用いた時に同定された(図1のA)。マウスT2BPのcDNA配列(配列番号4)は、5個のA+TリッチモチーフATTTAを3'非翻訳領域中に含む。これは、サイトカインや癌原遺伝子のような多くの短命mRNA中に見出されるものであり、従って、潜在的な不安定化要素である(16,17)。図1のBに示されるように、T2BPは、184個のアミノ酸残基から成り、等電点(pI)が4.79で分子量が21560と計算される。Pfamモチーフデータベース検索(<http://pfam.wustl.edu/index.html>)によりモチーフ解析を行ったところ、リン酸化ペプチド結合モチーフ(18,19)として知られるフォークヘッド関連(forkhead-associated (FHA))ドメインがT2BPの中央領域に位置することがわかった。さらに、BLASTにより相同性検索を行ったところ、マウスT2BPのヒトオーソログが同定された(図1のB、配列番号1、2)。マウス及びヒトT2BPは、アミノ酸配列全体に亘り高度に保存されていた。

【0025】

なお、図1のAは、哺乳動物2-ハイブリッドアッセイの結果を示す。プレイ-TRAF2及び/又はバイト(bait)-T2BPを、レポーターベクターpG5lucと共にCHO-K1細胞にトランスフェクトしてレポーター遺伝子であるルシフェラーゼの活性を測定した。プレイ-TRAF2又はバイト-T2BPトランスフェクションについての平均値を基礎にして相対値を計算した。

【 0 0 2 6 】

図 1 の B は、マウス及びヒト T2BP (それぞれ mT2BP 及び hT2BP と記載) のアミノ酸配列を示す。両者において同一のアミノ酸残基は、背景に影をつけて示した。FHA 領域は枠で囲んで示す。マウス及びヒト T2BP のアミノ酸配列は、cDNA から推定したものである。

【 0 0 2 7 】

T2BP は、TRAF2 の TRAF ドメインと相互作用する

TRAF2 は、図 2 の A に示すように、数種類の周知のモチーフ (1-4) を有するアダプタータンパク質である。どのモチーフが T2BP との相互作用に関わるのかを調べるため、本願発明者らは、哺乳動物 2 - ハイブリッド法を用いて野生型 TRAF2 及びその欠失変異体との相互作用を調べた。その結果、最小の相互作用領域は、TRAF ドメインとして知られる、カルボキシ末端側の半分を包含することがわかった。TRAF ドメインは、TRAF-N 及び TRAF-C サブドメインに分けられる (20)。T2BP は、TRAF2 [1-357] 及び TRAF2 [348-501] のいずれとも相互作用しなかったので、T2BP との相互作用には両方のサブドメインが必要と考えられる。また、インビトロで GST-プルダウンアッセイを用いて同じ結果が得られている。次いで、TRAF2 との相互作用に参与する T2BP 中の領域を調べた (図 2 の B)。調べた欠失変異体のうち、T2BP [1-162] 以外の変異体は、TRAF2 との結合能を喪失していた。

【 0 0 2 8 】

なお、図 2 の A は、TRAF2 及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型 T2BP との相互作用を示す。図 2 の B は、T2BP 及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型 TRAF2 との相互作用を示す。

【 0 0 2 9 】

T2BP と TRAF2 との相互作用の免疫共沈降解析

T2BP と TRAF2 との相互作用は、免疫共沈降法により *in vivo* で確認された (図 3)。本願発明者らは、HA-タグを付けた T2BP 及び Myc-タグを付けた TRAF2 を産生する発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクトし、細胞抽出物を、抗 HA タグ抗体を用いて免疫沈降に付した。抗 Myc タグ抗体を用いたウェスタンブロット (図 3 の上段) により、Myc-TRAF2 が HA-T2BP と特異

的に免疫共沈降されたことが示された。

【0030】

なお、図3の中段は、細胞抽出物をウェスタンブロットに付し、HA-T2BPの発現を確認したもの、下段は同様にMyc-TRAF2の発現を確認したものである。また、図3において、IP及びIBはそれぞれ免疫沈降及び免疫ブロットを示す。

【0031】

T2BPの発現プロフィール

TRAF2とT2BPがこれらの間で相互作用を行うためには、これらが同じ組織で共に発現していることが必要であるので、ノーザンブロット分析によりT2BP及びTRAF2の発現プロフィールを調べた。T2BP cDNAをプローブとして用いた場合、2.3 kbのシグナルが検出された。これは得られたcDNAのサイズである2.0 kbに対応する、合理的なサイズであった。T2BPは、成体の主な組織において普遍的に発現されていた(図4)。主なシグナルに加え、T2BPについて3.0 kbと4.0 kbに弱い2つのシグナルが観察された。TRAF2 cDNAをプローブとして用いた結果からわかるように、TRAF2遺伝子は、成体の主な全ての組織中で同様に発現されており、これは先の報告(21)と一致している。次に、どのようなマウス培養細胞株においてT2BPが良く発現しているかを調べた。調べた培養細胞株は、PU5-1.8(PU5-R)、RAW264.7、K-BALB(K-234)、M-MSV-BALB/3T3、L-M、P19、Hepa1-6、R1.1、L1210、P388D1、P815及びNB41A3であった。これらのうち、T2BPは、RAW264.7、L1210、P388D1といった免疫系細胞由来の培養細胞で高発現していることが明らかとなった。

【0032】

T2BPをトランスフェクトした293細胞中でのNF- κ B及びAP-1の活性化

NF- κ B及びAP-1のTNF-誘導活性化は、293細胞を包含する数種類のセルラインにおいて良く確立されており、そこでは、TRAF2がシグナル伝達において鍵となる役割を果たす(11,22)。これらの経路に対するT2BPの効果を調べるために、ルシフェラーゼ活性によりNF- κ Bの活性化を検出することを可能にするレポーターベクターと共に、293細胞中でT2BPを過剰発現させた(図5の左)。レポーターベクターのみをトランスフェクトした293細胞をTNF処理すると、NF- κ B

の活性化が明瞭に観察された。T2BPの過剰発現により、TNF処理なしでNF- κ Bが濃度依存的に活性化された。T2BP-トランスフェクト293細胞をTNF処理した場合には、TNF処理していないT2BP-トランスフェクト293細胞と同等か僅かに低いNF- κ Bの活性化が見られた。AP-1の活性化に対するT2BPの効果を評価するために同様な実験を行った(図5の右)。TNF処理したコントロール293細胞中で、AP-1の活性化が観察された。TNFで処理していない293細胞中でT2BPを過剰発現させると、AP-1が濃度依存的に活性化された。T2BP-トランスフェクト細胞をTNF処理した場合、TNF処理していないT2BP-トランスフェクト細胞よりもAP-1の活性化が少なかった。このように、これらの結果は、T2BPの過剰発現により、NF- κ B及びAP-1の両方が、TNF処理なしで活性化されることを示している。

【0033】

文献

1. Bradley, J. R., and Pober, J. S. (2001) *Oncogene* 20, 6482-6491.
2. Wajant, H., Henkler, F., and Scheurich, P. (2001) *Cell Signal* 13, 389-400.
3. Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000) *Exp Cell Res* 254, 14-24.
4. Wajant, H., Grell, M., and Scheurich, P. (1999) *Cytokine Growth Factor Rev* 10, 15-26.
5. Baker, S. J., and Reddy, E. P. (1998) *Oncogene* 17, 3261-3270.
6. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995) *Cell* 81, 495-504.
7. Shu, H. B., Takeuchi, M., and Goeddel, D. V. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13973-13978.
8. Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. (1995) *Cell* 81, 513-523.
9. McCarthy, J. V., Ni, J., and Dixit, V. M. (1998) *J Biol Chem*

em 273, 16968-16975.

10. Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998) *Mol Cell* 2, 389-395.
11. Baud, V., and Karin, M. (2001) *Trends Cell Biol* 11, 372-377.
12. Baud, V., Liu, Z. G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y., and Karin, M. (1999) *Genes Dev* 13, 1297-1308.
13. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995) *Cell* 81, 505-512.
14. Hu, W. H., Johnson, H., and Shu, H. B. (2000) *J Biol Chem* 275, 10838-10844.
15. Suzuki, H., Fukunishi, Y., Kagawa, I., Saito, R., Oda, H., Endo, T., Kondo, S., Bono, H., Okazaki, Y., and Hayashizaki, Y. (2001) *Genome Res* 11, 1758-1765.
16. Wilson, G. M., and Brewer, G. (1999) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 257-291.
17. Guhaniyogi, J., and Brewer, G. (2001) *Gene* 265, 11-23.
18. Li, J., Lee, G. I., Van Doren, S. R., and Walker, J. C. (2000) *J Cell Sci* 113 Pt 23, 4143-4149.
19. Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A. R., and Jackson, S. P. (1999) *Mol Cell* 4, 387-394.
20. Cheng, G., Cleary, A. M., Ye, Z. S., Hong, D. I., Lederman, S., and Baltimore, D. (1995) *Science* 267, 1494-1498.
21. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V. (1994) *Cell* 78, 681-692.
22. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995) *Science* 269, 1424-1427.
23. Hofmann, K., and Bucher, P. (1995) *Trends Biochem Sci* 20,

347-349.

24. Arch, R. H., Gedrich, R. W., and Thompson, C. B. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 272, 936-945.
25. Takeuchi, M., Rothe, M., and Goeddel, D. V. (1996) *J Biol Chem* 271, 19935-19942.
26. Qian, Y., Commene, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Li, X. (2001) *J Biol Chem* 276, 41661-41667.
27. Rothe, J., Gehr, G., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1992) *Immunol Res* 11, 81-90.
28. Wajant, H., and Scheurich, P. (2001) *Int J Biochem Cell Biol* 33, 19-32.
29. Gravallesse, E. M., Galson, D. L., Goldring, S. R., and Aron, P. E. (2001) *Arthritis Res* 3, 6-12.
30. Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S., and Inoue, J. (2001) *Embo J* 20, 1271-1280.
31. Zhang, Y. H., Heulsmann, A., Tondravi, M. M., Mukherjee, A., and Abu-Amer, Y. (2001) *J Biol Chem* 276, 563-568.

【 0 0 3 4 】

【発明の効果】

本発明により、TRAF2と結合する新規なポリペプチド及びそれをコードする核酸が初めて提供された。本発明のポリペプチドは、TRAF2と結合するので、TRAF2が介在するシグナル伝達の研究において重要である。また、本発明のポリペプチドは、NF- κ Bシグナルを活性化させ、それがTNFを介した伝達であることが示唆されることから、その機能を阻害することにより、NF- κ Bシグナルを減弱させることが可能である。よって、NF- κ Bシグナルが関与する疾患として炎症、リウマチなどの治療薬開発のためのターゲットとして有用である。また、NF- κ Bシグナルは破骨細胞の活性化にも関与しているので、骨そしょう症治療薬開発のためのターゲットとしても有用である。

【 0 0 3 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>

<120> Novel Polypeptide and Nucleic Acid Encoding the Same

<130>

<160>

【 0 0 3 6 】

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Ser Phe Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Thr Val Tyr His Pro Gly Gln Leu Gln Cys Gly Ile Phe Gln
 20 25 30
 Ser Ile Ser Phe Asn Arg Glu Lys Leu Pro Ser Ser Glu Val Val Lys
 35 40 45
 Phe Gly Arg Asn Ser Asn Ile Cys His Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln
 50 55 60
 Val Ser Arg Val Gln Phe Ser Leu Gln Leu Phe Lys Lys Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Ser Val Leu Ser Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Asn Leu
 85 90 95
 Ile Val Asp Ser Arg Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro
 100 105 110
 Tyr Arg Cys Met Val Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Met Glu Lys

115 120 125
 Glu Asp Gly Glu Ser Leu Glu Phe Phe Glu Thr Gln Phe Ile Leu Ser
 130 135 140
 Pro Arg Ser Leu Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Pro His Arg Pro Ile
 145 150 155 160
 Pro Glu Tyr Gly Thr Tyr Ser Leu Cys Ser Ser Gln Ser Ser Ser Pro
 165 170 175
 Thr Glu Met Asp Glu Asn Glu Ser

180

【 0 0 3 7 】

<210> 2

<211> 1613

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcacgaggg agaggacgtg ctctgccagc cagtgggaag gcaggccgcg cgcgcgggag 60
 cgcgggagga tcggcggctc gcggtcactg gtccctggct cggttccccg caccgccggg 120
 ctcacactta cccgcgcgga ggagcagcgg ccgggtgtcc acccccatcc tgcgcccagt 180
 ctctctgatt cccctcgctc tgagccggga gagccgaaca gctgaagaga gttcactgac 240
 tccccagccc caggtgggcc ttgtgcacat c atg acc agt ttt gaa gat gct 292

Met Thr Ser Phe Glu Asp Ala

1

5

gac aca gaa gag aca gta act tgt ctc cag atg acg gtt tac cat cct 340
 Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu Gln Met Thr Val Tyr His Pro

10

15

20

ggc cag ttg cag tgt gga ata ttt cag tca ata agt ttt aac aga gag 388
 Gly Gln Leu Gln Cys Gly Ile Phe Gln Ser Ile Ser Phe Asn Arg Glu

25

30

35

aaa ctc cct tcc agc gaa gtg gtg aaa ttt ggc cga aat tcc aac atc 436

Lys	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Gly	Arg	Asn	Ser	Asn	Ile	
40					45					50					55	
tgt	cat	tat	act	ttt	cag	gac	aaa	cag	ggt	tcc	cga	ggt	cag	ttt	tct	484
Cys	His	Tyr	Thr	Phe	Gln	Asp	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Val	Gln	Phe	Ser	
				60					65					70		
ctg	cag	ctg	ttt	aaa	aaa	ttc	aac	agc	tca	ggt	ctc	tcc	ttt	gaa	ata	532
Leu	Gln	Leu	Phe	Lys	Lys	Phe	Asn	Ser	Ser	Val	Leu	Ser	Phe	Glu	Ile	
				75					80					85		
aaa	aat	atg	agt	aaa	aag	acc	aat	ctg	atc	gtg	gac	agc	aga	gag	ctg	580
Lys	Asn	Met	Ser	Lys	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Val	Asp	Ser	Arg	Glu	Leu	
		90					95							100		
ggc	tac	cta	aat	aaa	atg	gac	ctg	cca	tac	agg	tgc	atg	gtc	aga	ttc	628
Gly	Tyr	Leu	Asn	Lys	Met	Asp	Leu	Pro	Tyr	Arg	Cys	Met	Val	Arg	Phe	
		105					110							115		
gga	gag	tat	cag	ttt	ctg	atg	gag	aag	gaa	gat	ggc	gag	tca	ttg	gaa	676
Gly	Glu	Tyr	Gln	Phe	Leu	Met	Glu	Lys	Glu	Asp	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	
		120					125							130		
ttt	ttt	gag	act	caa	ttt	att	tta	tct	cca	aga	tca	ctc	ttg	caa	gaa	724
Phe	Phe	Glu	Thr	Gln	Phe	Ile	Leu	Ser	Pro	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Glu	
				140						145				150		
aac	aac	tgg	cca	cca	cac	agg	ccc	ata	ccg	gag	tat	ggc	act	tac	tcg	772
Asn	Asn	Trp	Pro	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Pro	Glu	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Ser	
				155					160					165		
ctc	tgc	tcc	tcc	caa	agc	agt	tct	ccg	aca	gaa	atg	gat	gaa	aat	gag	820
Leu	Cys	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	Glu	Met	Asp	Glu	Asn	Glu	
				170					175					180		
tca	tgaacacaga	aagtctaaga	ggagaaatat	gatggatgaa	gagctctgta											873
Ser																

gatgctgtat agacactaaa taagagtga ttaggtagt atattatagt catctgttat 933
gctgtgaaat ttggaattca aaattttgaa gtctgtaaat tgtgttagtc attaacttag 993
tcacctgttg tattctggat ctacacaaaa ttattttaag tgctcttatt aatctgtgag 1053ga
ttaatata caaaaagtat cctttgagat gaagtcgtg tctcaaaata aggttatatt 1113
atcttctttt tctgcttgat tttcatcttg tgttttgctt tgtttttgta aggaaccatc 1173
tcttggtttg gtcacatcag ttcacaacag ccatttgttt tcaaggtcaa ggctccaggc 1233
aggttggttac tgggtgttgc agcctgtcag tacttgtagt actggaatag gttctaggct 1293
agtgtctgcg cgtcactgtg gtttttagcat gggaggactt atttgagaaa tactacctta 1353
cttttctatg atttcttttt acagagttat agtgtgttta ctcttaagat gacagttctc 1413
tttgtctata ttcagcatct aagacaaata tttaaacatt ttaaagaacc actgtgttaa 1473
gtttaggatt atttacttac caaattagaa gtttgacttt tatgtgttat acacaatctt 1533
aaaatttcac gaattcacct ttttaatagt atccatgtac ataataaaat caaagtttaa 1593
ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1613

【 0 0 3 8 】

<210> 3

<211> 184

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Met Ser Thr Phe Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu
1 5 10 15
Gln Met Thr Ile Tyr His Pro Gly Gln Gln Ser Gly Ile Phe Lys Ser
20 25 30
Ile Arg Phe Cys Ser Lys Glu Lys Phe Pro Ser Ile Glu Val Val Lys
35 40 45
Phe Gly Arg Asn Ser Asn Met Cys Gln Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln
50 55 60
Val Ser Arg Ile Gln Phe Val Leu Gln Pro Phe Lys Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Ser Val Leu Ser Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Ser Leu
85 90 95
Met Val Asp Asn Gln Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro
100 105 110
Tyr Lys Cys Met Leu Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Leu Gln Lys
115 120 125
Glu Asp Gly Glu Ser Val Glu Ser Phe Glu Thr Gln Phe Ile Met Ser
130 135 140
Ser Arg Pro Leu Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Thr Gln Asn Pro Ile
145 150 155 160
Pro Glu Asp Gly Met Tyr Ser Ser Tyr Phe Thr His Arg Ser Ser Pro
165 170 175
Ser Glu Met Asp Glu Asn Glu Leu
180

【 0 0 3 9 】

<210> 4

<211> 1970

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 4

gagttaggag cagcttgctc cgcgtgcgca gctgggttgt cagtgcctgcg gtgtaccta 60
cacaccgaca cagaccctc ttttttctcc caggagagga gacaaggctc aggagtcctg 120
atctagctgt ggccactgga agactctcag gccggggagc gtc atg tcc acc ttt 175
Met Ser Thr Phe
1
gaa gac gct gat aca gag gag acg gtc act tgt ctc cag atg acc att 223
Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu Gln Met Thr Ile
5 10 15 20
tac cat cct ggc caa caa agt ggg ata ttt aaa tca ata agg ttt tgc 271

Tyr His Pro Gly- Gln Gln Ser Gly Ile Phe Lys Ser Ile Arg Phe Cys	
25 30 35	
agc aaa gag aag ttt cct tcc att gaa gtg gtg aaa ttt gga cgc aat	319
Ser Lys Glu Lys Phe Pro Ser Ile Glu Val Val Lys Phe Gly Arg Asn	
40 45 50	
tcc aac atg tgc cag tat acg ttt cag gac aaa cag gtg tcc cga att	367
Ser Asn Met Cys Gln Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln Val Ser Arg Ile	
55 60 65	
cag ttt gtt tta cag ccg ttt aaa cag ttc aac agc tcc gtt ctc tcg	415
Gln Phe Val Leu Gln Pro Phe Lys Gln Phe Asn Ser Ser Val Leu Ser	
70 75 80	
ttt gaa ata aaa aac atg agc aag aaa acc agt ttg atg gta gac aac	463
Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Ser Leu Met Val Asp Asn	
85 90 95 100	
cag gag ctc ggc tac ctc aat aaa atg gac ctg cct tac aag tgt atg	511
Gln Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro Tyr Lys Cys Met	
105 110 115	
ctc agg ttc gga gag tat cag ttc ctg ttg cag aag gaa gac gga gag	559
Leu Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Leu Gln Lys Glu Asp Gly Glu	
120 125 130	
tcg gtg gaa tct ttt gag act caa ttt atc atg tct tca aga cct ctc	607
Ser Val Glu Ser Phe Glu Thr Gln Phe Ile Met Ser Ser Arg Pro Leu	
135 140 145	
ttg caa gaa aac aac tgg cca aca cag aat ccc ata cca gag gat ggg	655
Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Thr Gln Asn Pro Ile Pro Glu Asp Gly	
150 155 160	
atg tat tct tca tac ttc acc cac aga agt tct cct tca gaa atg gat	703
Met Tyr Ser Ser Tyr Phe Thr His Arg Ser Ser Pro Ser Glu Met Asp	
165 170 175 180	

gaa aac gaa ctg tgaagagggt ccaactggag acacattgaa ggatgaggac

755

Glu Asn Glu Leu

acatgggtcg gatgtcaaga gacatcctac ttccgagttt gtgagtgtag cgtagcgcgg 815
 ctgtcctcat gctgactttc gttttggtaa tagcatttgg aagtctctag actgtgttaa 875
 tcatcaactt agtcaactga gtttcggctc tacaaagaat taagtgtaca tctgtaaggg 935
 ttgggtgcatc agacacgtct tctgggtaat gaggtcaccc ttgttgcttt tctgcatgat 995
 gttaccccca tgctttgtct tgggtggcagc catctcttgg cccggtcaca tcatttcgta 1055
 gcagcctttg tttttcaggt ttagagctcg ggcagattgc tcaactgggtgt ctgtggcgtg 1115
 ctagcgcttg tagaactaga gtcctggaat aagttctaga gtgctgagtc actgagtcac 1175
 catggcttcc ttatggaaag acttgggaaa tagctccttg attttctttc tgtggaacgg 1235
 tagtgtcgct ttcctatatg taggacctac acaaacatt taaagaacac tgagatgaag 1295
 atggttttct tacaatattg aaagtgaatt ttatgtatct cacagattta aaaatggcag 1355
 aaatcaaaac ttttaacagc ctctttgcac atgataaagc cggagcccag ttccttagtt 1415
 gcttctttgg aacttcttaa aggaaaacat gtattcttaa aggaaaacat ctattcttag 1475
 gctgccctat agaagtcagt acctgtgaat atttatatta aatgcttaat tatttctaaa 1535
 attttagttt cacataaagt tgtatttatt taaaagattc tcattcactt cattttggct 1595
 agattaagat gaatgttagt gaacattatg taaaagagga tgaaagccat taagttaaga 1655
 taaattctag cactactagt aagtaaggca ccctgtatag ctccctctgt aaatgaaatt 1715
 taatgctgta acaggtacag gatthtgggt aggggaggag gtcaggtggg ggaagttagc 1775
 cacattcata ttttgttttt gttttgtttt ttgtttttgt ttttgttttc caacaatagc 1835
 ttgctttgaa gtcaggctg gcttgggaact cttgatcctc atacatcggc cccctgaatg 1895
 ctgtgcctag cttaatgtaa ctgtatttct gcaacagccc tttgaaatta tttctaataa 1955
 actgtttggc ctagt 1970

【 0 0 4 0 】

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 5

gaaggagccg ccaccatgtc cacctttgaa gacg

34

【 0 0 4 1 】

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 6

gaaggagccg ccaccatggc tgcagccagt gt

32

【 0 0 4 2 】

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

agcggataac aatttcacac aggaaa

26

【 0 0 4 3 】

<210> 8

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctgca gacatgataa gatacattg

49

【 0 0 4 4 】

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 9

agcaagttca gcctgggttaa gacccctatc gattttacca c

41

【 0 0 4 5 】

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 10

ccaatatgac cgccatgttg gc

22

【 0 0 4 6 】

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

catgggtggcg gctccttccg gcgatacagt caactg

36

【 0 0 4 7 】

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 12

ccaatatgac cgccatgttg gc

22

【 0 0 4 8 】

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 13

catggtggcg gctccttcaa gtcgacggat ccctggc

37

【 0 0 4 9 】

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 14

gccatgttgg cattgattat tgac

24

【 0 0 5 0 】

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 15

agcaagttca gcctgggtaa g

21

【 0 0 5 1 】

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 16

gacgcgtcga ccatgtccac ctttgaagac g

31

【 0 0 5 2 】

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 17

gacgcgtcga ccatggctgc agccagtgt

29

【 0 0 5 3 】

<210> 18

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 18

ccggttaagc ggccgcagcg gataacaatt tcacacagga aac

43

【図面の簡単な説明】

【図 1】

Aは、哺乳動物 2 - ハイブリッド法の結果を示し、Bは、ヒト及びマウス T2BP のアミノ酸配列を比較して示す図である。

【図 2】

Aは、TRAF2及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型 T2BP との相互作用を示し、Bは、T2BP及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型 TRAF2との相互作用を示す。

【図 3】

本発明の実施例で行った、T2BPが TRAF2と結合することを示す免疫共沈降の結果を示す図である。

【図 4】

本発明の実施例で行った、各種組織中の T2BP の発現を示す、ノーザンブロット分析の結果を示す図である。

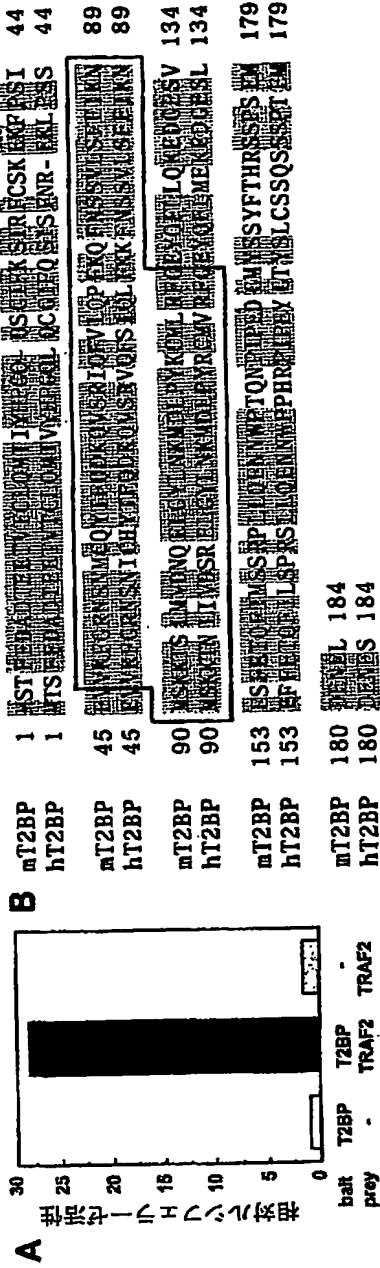
【図 5】

本発明の実施例で行った、T2BPをトランスフェクトした 2 9 3 細胞中での NF- κ B及び AP-1の活性化を示す、T2BP量と相対ルシフェラーゼ活性の関係を示す図である。

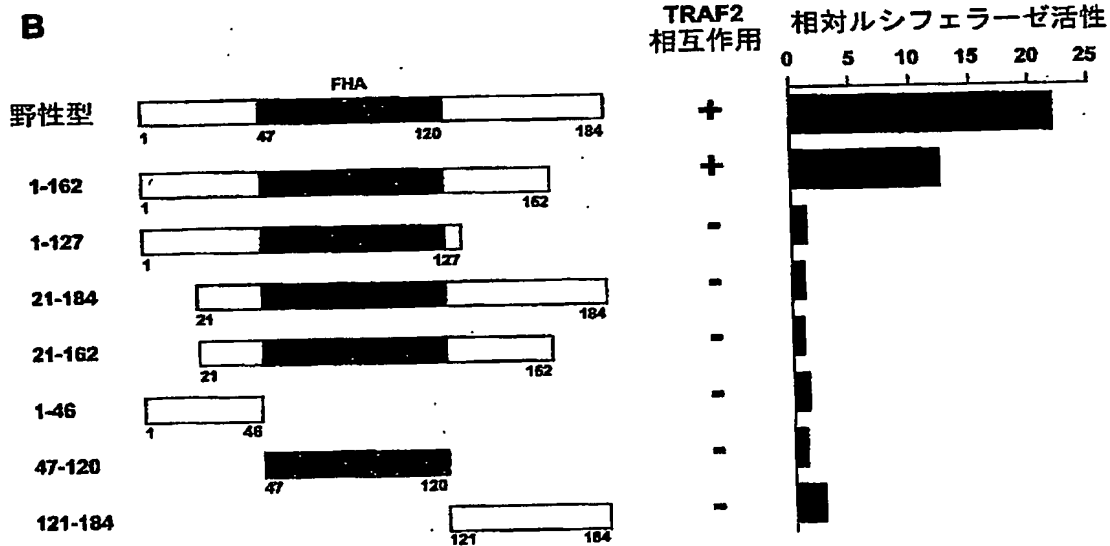
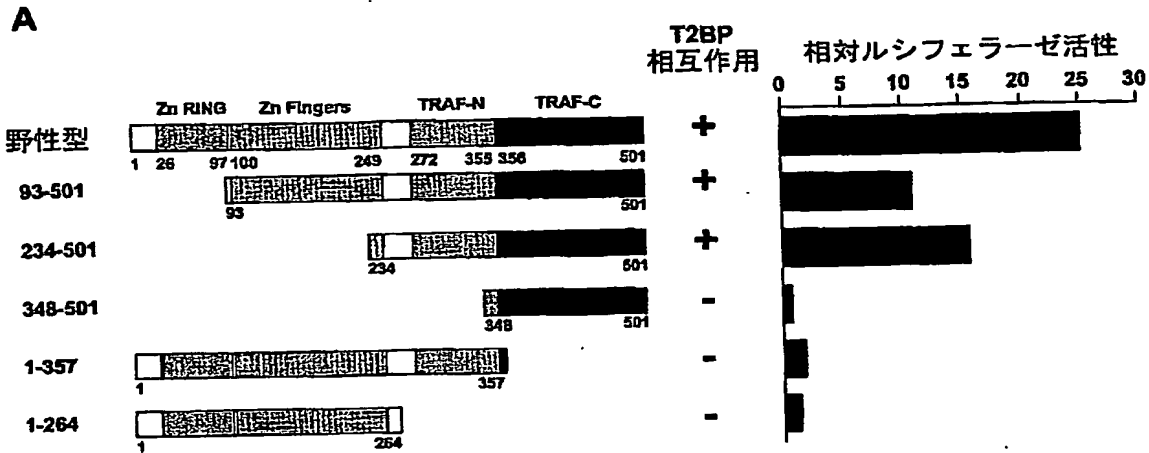
【書類名】

図面

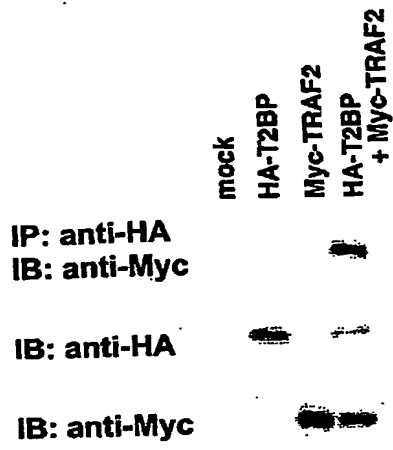
【図 1】



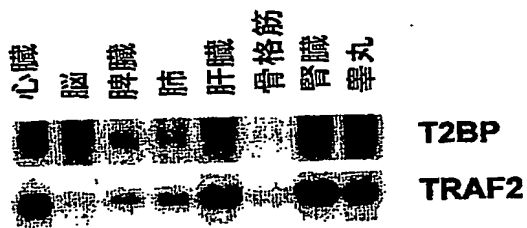
【図 2】



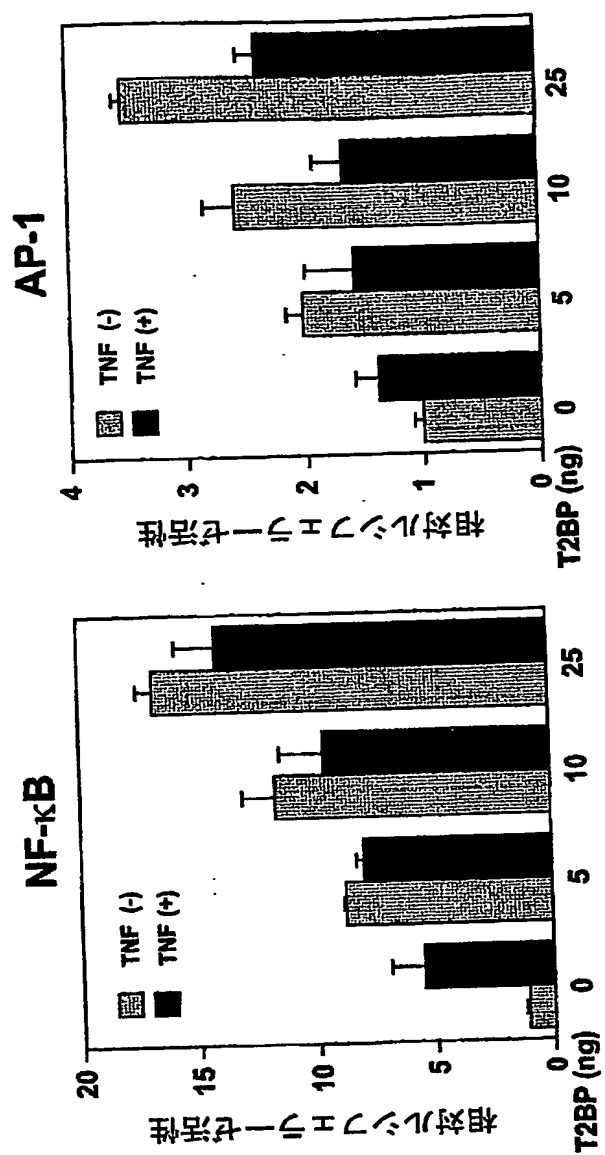
【図 3】



【図 4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腫瘍壊死因子レセプター関連因子 (TRAF2) と結合する新規なタンパク質及びそれをコードする核酸を提供すること。

【解決手段】 マウス cDNA ライブラリーから、哺乳動物 2-ハイブリッドアッセイ (mammalian two-hybrid assay) により、TRAF2 と結合する新規なタンパク質をコードする cDNA を見出し、かつ、これによりコードされるタンパク質が TRAF2 と結合することを実験的に確認し、その塩基配列を決定した。

【効果】 本発明のポリペプチドは、TRAF2 と結合するので、TRAF2 が介在するシグナル伝達の研究において重要である。また、本発明のポリペプチドは、NF- κ B シグナルを活性化させ、それが TNF を介した伝達であることが示唆されることから、その機能を阻害することにより、NF- κ B シグナルを減弱させることが可能である。

【選択図】 図 2

特2002-100431

認定・付加情報

特許出願の番号

特願2002-100431

受付番号

50200476398

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0094

作成日

平成14年 6月14日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年 4月 2日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501293666]

1. 変更年月日	2002年 3月26日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区三田1丁目3番35号
氏 名	株式会社ダナフォーム